

اثر نيزين بر تعدادی از باکتریهای بیماریزای تشکیل دهنده بیوفيلم با استفاده از روش میکروتیتريپليت

منیژه مهدوی*، دکتر محمد جلالی**، دکتر روحا کسری کرمانشاهی***

*دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی- گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان، **استادیار گروه تغذیه - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ***استاد گروه زیست شناسی- دانشگاه اصفهان.

تاریخ دریافت: ۱۵/۱۲/۷ تاریخ تایید: ۱۶/۵/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: بعضی از باکتریهای پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی قادر می باشند به سطوح در تماس با مواد غذایی متصل شده و تشکیل بیوفيلم دهند، از این جهت به عنوان منبع آلودگی محصولات غذایی و انتقال بیماری ها در نظر گرفته می شوند. نيزين، باکتریوسين پپتیدی می باشد که برای کنترل بیولوژیکی بیوفيلم های میکروبی استفاده می گردد. همچنین امروزه نيزين در ادغام با مواد بسته بندی، مواد غذایی را از خطر فساد و ورود عوامل بیماریزا محافظت می کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت های مختلف نيزين بر روی برخی از باکتریهای بیماریزای غذایی بوده است.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی اثرات غلظت های مختلف نيزين بر باکتریهای تشکیل دهنده بیوفيلم و بیماریزای *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes* و *Salmonella enteritidis* با روش میکروتیتريپليت بررسی شد. میزان کاهش سلول های تشکیل دهنده بیوفيلم با استفاده از دستگاه الیزا ریدر و میزان کشته شدن سلول ها با به کار بردن رنگ TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) تعیین شد. داده ها با استفاده از آزمون های آنالیز واریانس و آزمون مقایسه ای Tukey-Kramer و به کمک نرم افزار Minitab تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: نتایج نشان داد نيزين در غلظتی که مصرف آن مجاز است (4×10^3 IU/ml)، بر بیوفيلم *S. enteritidis* نسبت به بیوفيلم باکتری های *L. monocytogenes* و *Staph. aureus* به ترتیب با ۸۷، ۵۷ و ۳۰ درصد موثرتر می باشد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه افزایش غلظت بیش از حد مجاز نيزين تاثیری در میزان حذف و کشته شدن باکتری های مورد مطالعه ندارد و در حد مجاز بیشترین تاثیر را بر حذف بیوفيلم باکتری های *S. enteritidis* دارد.

واژه های کلیدی: بیوفيلم، ضد میکروبی، نيزين، میکروتیتريپليت، مواد پلیمریک.

مقدمه:

پلیمریک خارج سلولی که ایجاد مانع در برابر نفوذ عوامل ضد میکروبی می کند، به بسیاری از شرایط سخت مقاوم می باشد (۵) و می توانند به انواع سطوح موجود در تجهیزات مانند پلاستیک، شیشه، فلز، چوب و محصولات غذایی متصل شوند (۸،۷،۶).

اولین بار Zottola و Sasahara به اتصال باکتری های بیماری زای غذایی (Foodborne) مانند

در صنایع غذایی اتصال باکتری های پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرآیندهای تولید و بسته بندی آنها و نهایتاً، تشکیل بیوفيلم های میکروبی، می تواند منبع بالقوه آلودگی و فساد محصولات و فرآورده های غذایی و نیز انتقال بیماریهای ناشی از غذا باشد (۴-۱). بیوفيلم ها به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد

^۱ نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه علوم پزشکی - دانشکده بهداشت- گروه تغذیه - تلفن: ۷۹۲۳۷۸۱-۰۳۱۱، E-mail: Jalali@mui.ac.ir

Pseudomonas fragi به سطوح استیل در سیستم های غذایی پی بردند (۹). بعد از آن Mafu و همکاران نیز اتصال لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) را به سطوح استیل، شیشه، پلی پروپیلن و سطوح پلاستیکی در مدت ۲۰ دقیقه گزارش کردند (۱۰). لیستریا مونوسیتوژنز بر بسیاری سطوح از جنس بسته بندی مواد غذایی می تواند تشکیل بیوفیلم دهد. بنابراین گونه های لیستریا برای رشد و بقا بر روی جایگاههای متفاوتی که در تجهیزات تولید مواد غذایی یافت می شود، بسیار مناسب می باشند (۱۱). *Salmonella* نیز بر روی بسیاری سطوح از جنس پلاستیک و استیل می تواند تشکیل بیوفیلم دهد (۱۲، ۱۳). در سال ۱۹۹۶ تحقیقی در فرانسه نشان داد که ۴۰/۵ درصد از عفونت های ناشی از مواد غذایی در ارتباط با آلودگی وسایل و موادی است که خطر تشکیل بیوفیلم در آنها وجود دارد (۱۴). در سال ۱۹۹۸ در آمریکا آلودگی گوشت های همبرگر با *E. coli* و ورود لیستریا مونوسیتوژنز در سیستم های تولید شیر پاستوریزه و پنیر گزارش شد (۱۵).

هدف از بسته بندی مواد غذایی، افزایش مدت زمان نگهداری مواد غذایی با جلوگیری از ورود عوامل فساد می باشد. به عبارت دیگر بسته بندی، محافظ و نگهدارنده محصول در برابر عوامل مختلفی مانند ضربه، شرایط اقلیمی (رطوبت و دما)، بو، گاز و میکروارگانیسم ها می باشد. از این رو بسته بندی های مختلف با کارآیی های متفاوت و بیشتر در مورد مواد غذایی به وجود آمده است. یکی از این انواع بسته بندی، بسته بندی ضد میکروبی می باشد که در واقع یک نوع بسته بندی فعال است (۳). در این نوع بسته بندی با ادغام مواد ضد میکروبی مواد بسته بندی، کارآیی آن افزایش می یابد. افزایش مدت نگهداری ماده غذایی همراه با حفظ کیفیت و سلامتی با جلوگیری از رشد میکروبی از مزایای چنین نوع بسته بندی هایی می باشد. مواد ضد میکروبی ادغام در

پلیمرهای بسته بندی می تواند نیزین، سوربیک اسید، پروپیونیک اسید، پراکساید، کلرین اکساید، اوزون، سینامالدهید، آلایل ایزوتیوسیانات و لیزوزیم باشد. همچنین امروزه جدیدترین روش برای بیوکنترل تشکیل بیوفیلم، علاوه بر روشهای شیمیایی و فیزیکی معمول، جذب ترکیبات فعال زیستی مانند باکتریوسین ها به سطوح در تماس با مواد غذایی می باشد که می تواند از اتصال باکتری ها جلوگیری کند (۳).

باکتریوسین نیزین، یک پپتید ضد میکروبی است که اثرات ضد باکتریایی آن بر بسیاری از پاتوژن های غذایی و باکتری های فاسد کننده، بخصوص تشکیل دهنده های اسپور به اثبات رسیده است. نیزین هم اکنون در کشورهای متعددی به عنوان ماده محافظ طبیعی در صنایع غذایی به کار می رود و از مدت ها قبل جزء لیست GRAS (Generally Recognized As Safe) قرار گرفته است. این باکتریوسین به عنوان ماده محافظ طبیعی در غذاهای کم اسید و حرارت دیده استفاده می شود (۱۶).

باکتری های مورد آزمایش در این تحقیق از عوامل مهم بیماری های ناشی از غذا هستند. *L. monocytogenes* موجب عفونت لیستریوزیز، سپتیمی، مننژیت، سقط جنین و مسمومیت غذایی می گردد (۱۷). *S. enteritidis* مسمومیت غذایی و عفونت های روده ای را باعث می شود (۴) و نیز *Staph. aureus* عامل اتیولوژیک دامنه وسیعی از بیماریها مانند اندوکاردیت، اوستئومیلیت، سندرم شوک سمی، مسمومیت های غذایی و عفونت های پوستی می باشد (۱۸). اطلاعات بسیار اندکی در مورد سویه های جدا شده از مواد غذایی در ایران که قادر به تشکیل بیوفیلم هستند وجود دارد. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات غلظت های مختلف نیزین بر تعدادی از باکتری های بیماریزای غذایی تشکیل دهنده بیوفیلم مانند *Staph. aureus*، *L. monocytogenes* و *S. enteritidis* بود.

روش بررسی:

باکتری ها و محیط های کشت: باکتری های مورد استفاده در این تحقیق، *Staph. aureus* جداسازی شده از سطح اسلایسر کارخانه فرآورده گوشتی، *L. monocytogenes* RITCC1293serotype 4a و *S. enteritidis* RITCC1624 بود. دو سویه باکتری اخیر از موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی، کرج تهیه شد. باکتری *Staph. aureus*، *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* به ترتیب بر روی محیط کشت های اختصاصی *PALCAM* (Merck)، *XLD* (Merck) و *بردپارکر* (Merck) همراه با ساپلیمنت های مربوطه جهت اطمینان از خالص بودن، کشت و در یخچال نگهداری شدند.

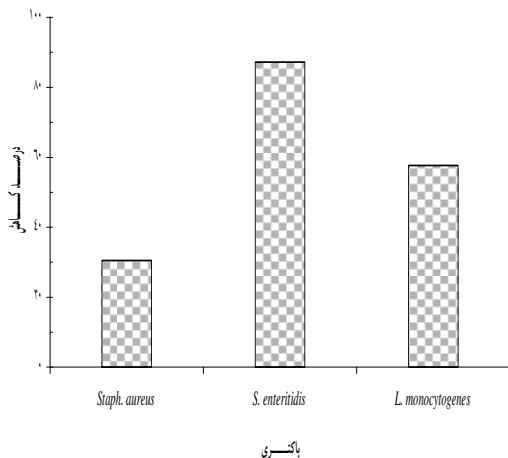
محلول ذخیره نیزین: ۱۰۰ میلی گرم از نیزین (نیزاپلن Sigma/۲/۵) در ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد تا غلظت آن به 10^4 IU/ml برسد ($1 \text{ IU} = 40 \text{ Mg}$). سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شد. این محلول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز گردید و برای تهیه رقت های مختلف از آب مقطر استریل استفاده شد (۱۹).

توانایی نیزین در حذف بیوفیلم: برای سنجش اثر ضد میکروبی نیزین در حذف بیوفیلم از روش *Stepanovic* و همکاران استفاده گردید (۲۰، ۱۵). بعد از آماده سازی کشت ۱۸ تا ۲۰ ساعته و فعال سازی باکتری ها، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر کدام از ایزوله ها تهیه شد. سپس این سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۱۰۰ در تریپتیکاز سوی برات استریل رقیق شد و تمام چاهک ها در یک پلیت ۹۶ خانه ای با $250 \times 10^4 \text{ cfu/well}$ میکرولیتر از این محیط پر شدند. سپس، سطح پلیت ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. بعد از خالی کردن محتویات چاهک ها و شستشوی آنها به میزان ۲۵۰ میکرولیتر نیزین به مدت یک ساعت به

هر چاهک اضافه شد. همچنین هر ۸ چاهک در یک ستون، تیمار مشابه دریافت کردند. به دلیل این که احتمال می رود تراکم بالای سلول ها در بیوفیلم، عامل ضد میکروبی بکار رفته با این حجم (۲۵۰ میکرولیتر) را خنثی کند، در هر بیست دقیقه یک بار عوض (Refresh) شدند. علاوه بر این ستون های تیمار شده، ستون های کنترل (حاوی بیوفیلم و بدون تیمار) و همچنین ستون های شاهد (حاوی محیط برات استریل) در هر پلیت در نظر گرفته شد.

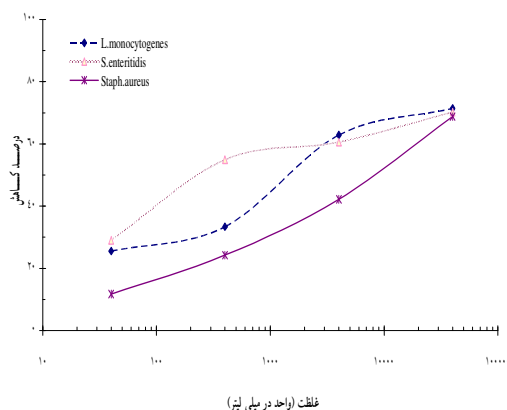
بعد از گذشت یک ساعت، عامل ضد میکروبی از چاهک ها شسته و خارج شد و با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. کریستال ویوله رنگی است که می تواند کل بیوفیلم را رنگ کند و رنگ مناسبی برای سنجش حذف بیوفیلم می باشد. بعد از ۵ دقیقه، چاهک ها با آب شیر شسته شدند و هاله های ارغوانی رنگ در چاهک های میکروپلیت مشاهده شدند. سپس چاهک ها با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد پر شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از آن پلیت ها به شدت تکان داده شدند و جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. سنجش کارایی بیوساید یا درصد کاهش بیوفیلم (Reduction Percent) از طریق جذب نوری چاهک های تیمار شده، کنترل و شاهد محاسبه گردید (۲۰).

میزان کشتن سلول های بیوفیلم توسط نیزین: جهت تعیین میزان سلول های زنده باقی مانده بیوفیلم از روش *Smith* و همکاران استفاده گردید (۲۱). بدین منظور از یک رنگ تنفسی به نام ۲، ۳ و ۵- تری فیل ترازولیوم کلراید (TTC) استفاده شد. TTC محلول در آب می باشد، پتانسیل ردوکس آن در حدود $0.8V$ می باشد و می تواند به عنوان پذیرنده الکترون برای هیدروژنازهای متفاوت عمل کند.



نمودار شماره ۲: مقایسه اثر حذفی غلظت 4×10^3 IU/ml نیزین بر بیوفیلیم باکتریها. $P < 0.05$ در تمام باکتری ها

غلظت مجاز آن در صنایع غذایی می باشد. حداکثر غلظت مجاز نیزین در مواد غذایی 4×10^3 IU/ml می باشد. با افزایش غلظت نیزین نزدیک به ۱۰۰ درصد بیوفیلیم های باکتریایی مورد آزمایش از بین رفته اند (نمودار شماره ۱). اثر حذفی نیزین در غلظت 4×10^4 IU/ml بر باکتری های *Staph. aureus*، *S. enteritidis* و *monocytogenes* یکسان می باشد ($P > 0.05$).



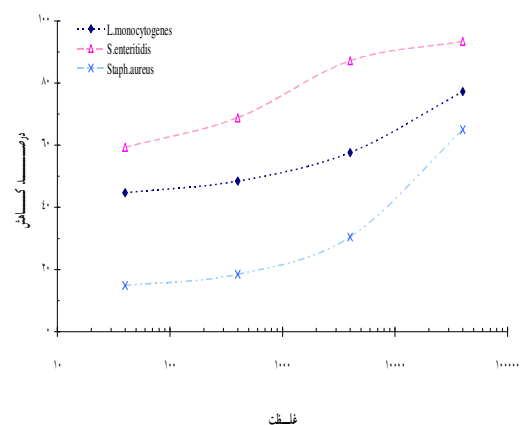
نمودار شماره ۳: اثر نیزین بر میزان کشته شدن سلول های بیوفیلیم. $P > 0.05$ در همه غلظت ها.

تقریباً تمام میکروارگانیسم ها توانایی احیاء TTC را به تری فیل فورمازان (TPF) دارند. از این توانایی جهت رنگ سنجی در طول موج ۴۵۰ nm استفاده شد. تمام مواد و وسایل لازم برای تعیین قدرت حذف بیوفیلیم، در این آزمایش نیز به کار رفتند، با این تفاوت که به جای رنگ کریستال ویوله از رنگ تری فیل ترازولوم کلراید ۲ درصد استفاده می شود. در نهایت بعد از شستشوی چاهک ها و استفاده از اسیداستیک گلاسیال ۳۳ درصد و انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد جذب نوری چاهک ها در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد.

داده ها با استفاده از آزمون های آماری آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه ای Tukey-Kramer و به کمک نرم افزار Excel و Minitab مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:

در این تحقیق اثر ضد میکروبی ماده محافظ نیزین در غلظت های متفاوت بر باکتریهای تشکیل دهنده بیوفیلیم با روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید. غلظت های متفاوت مورد استفاده نیزین بر اساس دامنه



نمودار شماره ۱: اثر نیزین بر میزان حذف سلول های بیوفیلیم $P < 0.05$ در غلظت های 4×10^3 IU/ml.

اما در غلظت 4×10^3 IU/ml بیشترین اثر حذفی نیزین با اختلاف معنی‌دار ابتدا بر *S. enteritidis* و سپس بر *Staph. aureus* و *L. monocytogenes* می‌باشد ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۲).

اثر کشندگی غلظت‌های مختلف نیزین بر باکتری‌های مورد آزمایش یکسان بود ($P > 0.05$) (نمودار شماره ۳).

بحث:

حذف ناقص بیوفیلم موجب رشد مجدد (Regrowth) قسمت باقیمانده بیوفیلم روی سطوحی که هنوز دارای تعدادی سلول‌های زنده هستند، می‌گردد. این پدیده باعث می‌شود که میکروارگانیسم‌ها بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی به حالت اولیه خود برگردند، ساختمان خود را تعمیر کنند و دوباره سبب آلودگی سیستم شوند. از این رو توجه به این نکته ضروری است که بعد از اثر عوامل ضد میکروبی چه میزان و یا چه تعداد از سلول‌های بیوفیلم هنوز زنده هستند و توانایی رشد و تکثیر را دارند. در تحقیق حاضر با درصد کشته شدن همه باکتری‌ها با افزایش غلظت نیزین معنی‌دار نمی‌باشد، بنابراین اثر کشندگی غلظت‌های مختلف نیزین بر باکتری‌های مورد آزمایش برابر است و همه حساسیت مشابهی نشان می‌دهند. همچنین از آنجایی که میزان کشته شدن باکتری‌های مختلف معنی‌دار نمی‌باشد، اثر کشندگی نیزین بر باکتری‌های مختلف هم یکسان نمی‌باشد. Nel و همکاران توانستند با استفاده از غلظت 3000 IU/ml نیزین تمام سلول‌های زنده بیوفیلم را بکشند، در حالی که حدود ۴۹-۴۲ درصد باکتری‌ها هنوز در اتصال به سطح استیل باقی مانده بودند (۲۲). در این تحقیق غلظت 4000 IU/ml نیزین در کشتن باکتری‌ها بر سطوح چندان موفق نبود، ولی اکثر آنها را از سطوح برداشت به طوری که اثر حذفی غلظت مجاز نیزین

(4×10^3 IU/ml) با اختلاف معنی‌داری بر *S. enteritidis* نسبت به بقیه باکتری‌ها بیشتر می‌باشد و نزدیک به ۹۰ درصد سلول‌های آن از بین رفته‌اند و ۶۰ درصد کشته شده‌اند در حالی که درصد کشته شدن و حذف سلول‌های باکتریایی مختلف در غلظت 4×10^4 IU/ml اختلاف معنی‌دار وجود نداشت.

در این پژوهش اثر حذفی و کشندگی افزایش غلظت نیزین بر سلول‌های بیوفیلم باکتری‌های *Staph. aureus*، *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* معنی‌دار نمی‌باشد. بنابراین افزایش غلظت بیش از حد مجاز تأثیری در میزان حذف و کشته شدن این باکتری‌ها ندارد. اما با این حال می‌توان گفت که نیزین بیشترین تأثیر را بر حذف بیوفیلم باکتری‌های *S. enteritidis* داشته است. از آنجایی که این باکتری بیماری‌زای غذایی است (۸) و با ورود به محیط‌های غذایی و تشکیل بیوفیلم به عنوان منبع آلودگی محصولات غذایی عمل می‌کند، این موضوع بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱۳، ۲۳).

در ضمن اثر حذفی نیزین بر *L. monocytogenes* نیز قابل توجه است (۵۷٪) و نزدیک به همین میزان درصد کشته شدن سلول‌های بیوفیلم آن دیده می‌شود (۶۲٪). به عبارتی می‌توان گفت که درصد حذف و کشته شدن سلول‌های بیوفیلم این باکتری بر اثر نیزین مشابه بوده است. *L. monocytogenes* در محیط‌های تولیدی فرآورده‌های گوشتی یافت می‌شود. معمولاً پاستوریزاسیون یا پختن شرایط عدم حضور این میکروارگانیسم را فراهم می‌کند، اما با این حال با تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح می‌تواند تا مدت‌ها زنده بماند و در نهایت در حین بسته‌بندی، فرآورده گوشتی را آلوده کند (۷). Gudbjornsdottir و همکاران در کارخانه فرآورده گوشتی آلودگی ۲/۳ درصد از محصولات با *L. monocytogenes* را نشان دادند (۲۴). برش گوشت‌های پخته شده موجب انتقال این باکتری و سایر عوامل بیماری‌زا می‌گردد.

باكتري هاي مهم بيماري زاي غذايي با افزايش غلظت، يکسان ارزيابي شد. همچنين اثر حذفي غلظت 4×10^3 IU/ml نيزين بر باكتري *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* نسبت به *Staph. aureus* بيشتر بود. لذا ادغام نيزين در حد مجاز در بسته بندي هاي ضد ميكروبي مي تواند به طور موثري مانع از تشكيل بيوفيلم باكتري ها و در نتيجه فساد مواد غذايي و انتقال عوامل بيماريزا گردد.

تشكر و قدرداني:

بدینوسله از تمامی کسانی که ما را در این طرح یاری نمودند قدردانی می گردد.

Arajjo و Carballo اثر نيزين را بر اتصال *L. monocytogenes* به سطوح مختلف بررسي کردند. آنها به اين نتيجه رسيدند که جذب $0.62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ نيزين به سطوح پلاستيک بيشترين کاهش را در اتصال باکترها ايجاد می کند (۲۵) که نتايج اين تحقيق به خوبي نشان می دهد نيزين تا حد زيادي می تواند از تشكيل بيوفيلم باكتري هاي بيماري زا جلوگيري کند و يا حتی بيوفيلم آنها را از بين ببرد. لذا ادغام آن در سطوح بسته بندي به عنوان بسته بندي ضد ميكروبي با غلظت مجاز آن (4×10^3 IU/ml) پيشنهاده می گردد.

نتيجه گيري:

در اين تحقيق اثرات حذفي و کشندگی نيزين بر بيوفيلم

منابع:

1. Cunliffe DA. Bacterial nitrification in chloraminated water supplies. Appl Environ Microbiol. 1991 Nov; 57(11): 3399-402.
2. Trachoo N. Biofilms and the food industry. J Sci Technol. 2003; 25(6): 807-15.
3. Han JH. Antimicrobial food packaging. Food Technol. 2000; 54(3): 56-65.
4. Sinde E, Carballo J. Attachment of Salmonella spp and *L. monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene the influence of free energy and the effect of commerical sanitizers. Food Microbiology. 2000 Agu; 17(4): 439-47.
5. den Aantrekker ED, Boom RM, Zwietering MH, van Schothorst M. Quantifying recontamination through factory environments: a review. Int J Food Microbiol. 2003 Jan; 80(2): 117-30.
6. Mittelman MW. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. J Dairy Sci. 1998 Oct; 81(10): 2760-4.
7. Jessen B, Lammert L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. Int Biodeterior Biodegradation. 2003; 51(4): 265-9.
8. Sharma M, Anand SK. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. Food Microbiol. 2002; 19: 627-36.
9. Zottola EA, Sasahara KC. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern? Int J Food Microbiol. 1994 Oct; 23(2): 125-48.
10. Mafu AA, Roy D, Goulet J, Savoie L, Roy R. Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces. J Dairy Sci. 1990 Dec; 73(12): 3428-32.
11. Chae MS, Scgraff H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. Food Microbiol. 2001; 18(1): 103-12.
12. Neil HM. Reflections on Salmonella and other "wee Beasts" in foods. Food Technol. 2001; 55: 61-7.

13. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol*. 2001 Mar; 64(3): 367-72.
14. Bryers JD. *Biofilms II: process analysis and application*. New York: John Wiley and Sons; 2000. p: 154-63.
15. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Jun; 68(6): 2950-8.
16. Sindt RH. Agency response letter GRAS notice. 2001 Apr. Available on [http:// www. cfsan. fda.gov/rdb/opa-g065.html](http://www.cfsan.fda.gov/rdb/opa-g065.html).
17. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*. 1991 Dec; 55(4): 752.
18. Mack D, Rohde H, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch JK, et al. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun*. 2000 Jul; 68(7): 3799-807.
19. McAuliffe O, Ross RP, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*. 2001 May; 25(3): 285-308.
20. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000 Apr; 40(2): 175-9.
21. Smith JJ, McFeters GA. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *J Microbiol Methods*. 1997; 29(3): 161-75.
22. Nel HA, Bauer R, Wolfoordt GM, Dicks LMT. Effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *Amer J Enol Vitic*. 2002; 53(3): 191-6.
23. Giaouris D, Nychas E. The adherence of *Salmonella enteritidis* PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *J Food Microbiol*. 2006 Dec; 23(8): 747-52.
24. Gudbjornsdottir B, Suihko ML, Gustavsson P, Thorkelsson G, Salo S, Sjoberg AM, et al. The incidence of *listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in Nordic countries. *Food Microbiol*. 2004; 21: 217-25.
25. Carballo L, Arajjo AB. Influence of surface characteristics of food contact materials on bacterial attachment. *Biomicro world. Int Conference of Biofilms in Spain*. 2005.